VERSUCHE ZUR GENAUEN QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON GLUCOSAMIN IM BLUT

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Peter Heintz

Saarbrücken

1974

AUS DER FACHRICHTUNG PHYSIOLOGISCHE CHEMIE
DES FACHBEREICHS 3 -THEORETISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

VERSUCHE ZUR GENAUEN QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON GLUCOSAMIN IM BLUT

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von

PETER HEINTZ

geb. am 18. Juni 1943 in Stettin

Dekan: Professor Dr. med. G. A. JUTZLER

Referenten: Professor Dr. rer. nat. H. J. HAAS
Professor Dr. rer. nat. H. E. KELLER

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 5.7.1974 abgelegt

Meinen Eltern gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. EINLEITUNG	4
2. THEMENSTELLUNG	7
3. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE, ERGEBNISSE	7
3.1 Halbquantitativer Nachweis freier Aminozucker im menschlichen Blutplasma	7
3.1.1 Papierchromatographischer Nachweis von authentischem Glucosamin-hydrochlorid	7
3.1.2 Papierchromatographischer Nachweis von Glucosamin-hydrochlorid im menschlichen Blutplasma	7
3.1.3 Ergebnis	8
3.2 Versuche zum quantitativen Nachweis von Glucosamin im Humanplasma nach der Methode von SCHWIERSCH	8
3.2.1 Ergebnisse	9
3.3 Versuche zum quantitativen Nachweis von Glucosamin im Humanplasma mittels Hochdruckchromatographie	9
3.3.1 Allgemeines	9
3.3.2 Apparatives	11
3.3.3 Fehlerquellen	14
3.3.4 Versuche zur quantitativen Bestimmung von Benzol	16
3.3.5 Versuche zum reproduzierbaren Injizieren von enteiweißtem Blutplasma	17

Seite

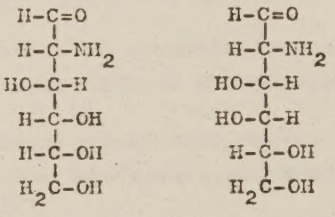
4. DISKUSSION 34

5. ZUSAMMENFASSUNG 36

6. LITERATUR 37

1. EINLEITUNG

Untersuchungen über den Stoffwechsel von 2-Desoxy-2-amino-D-glucose (I)[+] in Kaninchen- und Human-Erythrocyten haben gezeigt, daß nur Reticulocyten, insbesondere ihre erythroiden Vorläufer diesen Aminozucker synthetisieren und in eine aktivierte Verbindung überführen können (Lit.16).



I II

I wird nach N-Acetylierung u.a. in das Erythrocytenstroma eingebaut und auch als Baustein für hochmolekulare Glycoproteine der Membranen verwendet (Lit.11). Einige dieser Membranbestandteile, die neben I auch andere Aminozucker-beispielsweise 2-Desoxy-2-amino-D-galaktose (II) als N-Acetyl-derivat- enthalten können, haben immunologische Bedeutung, da sie die Spezifität der ABO-,MN-und Rh-Faktoren bestimmen (Lit.17,20 und 21). Ausgereifte Erythrocyten metabolisieren Aminozucker nicht, da ihnen die hierfür notwendigen Enzyme fehlen (Lit.16).

Auch im menschlichen Blutplasma sind Aminozucker vor allem Bestandteile von Glycoproteinen und Mucopolysacchariden. Zu diesen Verbindungstypen gehören beispielsweise Haptoglobine, Fibrinogen, α -Globulin (7S) und Heparin (Lit.7 und 23). Wie bisher bekannt ist, kommen auch in diesen Verbindungen neben anderen Aminozuckern vor allem I und II vor.

Der Serumspiegel des Glycoprotein -und damit des Aminozucker-gehaltes- ist altersabhängig: er ist bei Neugeborenen sehr niedrig und steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Zu einem raschen Anstieg im Plasma kommt es bei zahlreichen Erkrankungen. Erwähnt seien das Rheumatische Fieber, die

---

+) 2-Desoxy-2-amino-D-glucose wird, der Einfachheit halber, im folgenden "Glucosamin" genannt.-Die Formeln der Kohlenhydrate werden in offenkettiger Form und in der Schreibweise nach E.FISCHER angegeben.

aktive Tbc, die aktive Leukämie sowie manche Carcinome (Zit.nach Lit.23). "Freie" Aminozucker, d.h. solche, die nicht Bestandteile hochmolekularer Verbindungen sind, enthält das Blutplasma von Gesunden in nur geringen Mengen (Lit.23).

WEICKER (Lit.22) beobachtete, daß lebercirrhotische Tiere nach Verabreichung von D-Fructose mit dem Harn erhöhte Mengen an I ausscheiden. I entsteht wahrscheinlich auf dem Wege über eine HEYNS-Umlagerung aus D-Fructose und Ammoniak, das im Falle einer dekompensierten Lebercirrhose in erhöhtem Maße anfällt. Nach Verabreichung von D-Fructose an lebercirrhotische Tiere sollte daher die Blutzuckerkonzentration an I erhöht sein (Lit.12 und 13).

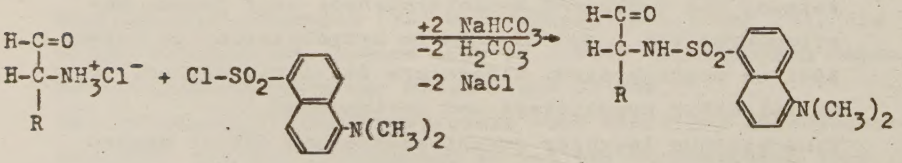
Die meisten der früher üblichen Methoden zum quantitativen Nachweis von I und anderen 2-Desoxy-2-amino-aldosen in biologischen Materialien lieferten recht unzuverlässige Werte. Dies gilt auch für die in Lit.23 mitgeteilten Ergebnisse. Hier wurde, wie in vielen anderen Fällen, zur Bestimmung von I die "ELSON-MORGAN-Reaktion", d.h. die Umsetzung mit Acetylaceton und p-Dimethylaminobenzaldehyd zu einem photometrierbaren roten Farbstoff verwendet (Lit.14). Da bei der "ELSON-MORGAN-Reaktion" nicht nur I, sondern auch manche andere Aminozucker und sogar Substanzen aus anderen Verbindungsklassen photometrierbare Rotfärbungen ergeben, ist es denkbar, daß auch die zitierten Angaben über den Gehalt des menschlichen Bluts an I nicht ganz zuverlässig sind.

KAAS und WEIGERDING fanden 1970 (Lit.6), daß durch Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol sehr genaue Bestimmungen von I und II auch in Hydrolysaten von Naturstoffen möglich sind. Allerdings ist diese Methode verhältnismäßig kompliziert und zeitraubend.

Eine weitaus leichter durchführbare und ebenso exakte Möglichkeit zur Bestimmung von I ist im gleichen Jahr von SCHWIERSCH beschrieben (Lit.19) und später von GRETH (Lit.4) modifiziert und verbessert sowie auf den quantitativen Nachweis anderer Aminozucker durch Ermittlung ihrer Umsatzgeschwindigkeit mit überschüssigem "Dansyl-

chlorid" (1-Dimethylamino-naphtalin-sulfonylchlorid-(5), III). Dieses Verfahren ist besonders günstig, weil die alkalilabilen Aminozucker in Form ihrer stabilen Salze eingesetzt werden können. Ein weiterer Vorteil ist, daß die wegen des erforderlichen Überschusses an Natriumhydrogencarbonat zu erwartenden partiellen Zersetzungen der Aminozucker und ihrer Reaktionsprodukte mit III die Bestimmungen nicht stören.

Beispielsweise wird das Hydrochlorid von I in Wasser/Aceton mit einem 8 bis 32-fachen Überschuß an III und einem 16,6-fachen Überschuß an Natriumhydrogencarbonat versetzt. Innerhalb der ersten 7 Minuten ist die Menge an entstehender, intensiv gelb fluoreszierender N-[1-Dimethylamino-naphtalin-sulfonyl (5)]-2-desoxy-2-amino-D-glucose (IV)[+] proportional der Ausgangskonzentration von I. Um diese festzustellen, werden gleichzeitig mit dem zu bestimmenden I bekannte Mengen an I (in definierten Konzentrationen) zu IV umgesetzt und innerhalb der ersten 7 Minuten nach Reaktionsbeginn aliquote Teile der Reaktionsgemische entnommen. Nach dünnschichtchromatographischer Abtrennung wird IV auf den Dünnschichtplatten nach Anregung bei 390 nm fluorometriert. Durch Vergleich der in der Analysenlösung entstandenen Menge an IV mit den in den Vergleichslösungen entstandenen Mengen können Konzentration und Menge an I in der Analysenlösung ermittelt werden. Die Flecke, die fluorometriert werden sollen, müssen mindestens 5×10^{-11} Mol Dansylglucosamin enthalten.



I-hydrochlorid III IV

R=CHOH-CHOH-CHOH-CH_2OH (D-arabo)

[+] IV wird im folgenden als "Dansylglucosamin" bezeichnet.

Bestimmungen (Fehler: ± 3,9%) sind möglich in Lösungen bis zu einer Minimalkonzentration von etwa 1 mg/ml.

2. THEMENSTELLUNG

Es sollte untersucht werden, ob die im menschlichen Blutplasma vorhandenen freien Aminozucker durch Umsetzung mit III quantitativ nachzuweisen sind. Anhand dieses Beispiels sollte gleichzeitig erstmals geprüft werden, ob diese Methode auch zur exakten Bestimmung von Aminozuckern in Gemischen biologischen Ursprungs verwendbar ist, wobei die Eignung verschiedener chromatographischer Systeme (Dünnschicht- und Hochdruckchromatographie) in die Untersuchungen einbezogen werden sollte.

3. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE, ERGEBNISSE

3.1 Halbquantitativer Nachweis freier Aminozucker im menschlichen Blutplasma

3.1.1 Papierchromatographischer Nachweis von authentischem Glucosamin-hydrochlorid. -Je 0,01 ml von wäßrigen Lösungen von I-hydrochlorid (Fa. SERVA, Heidelberg) wurde auf Chromatographie-Papier (Nr. 2043b, Mgl der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel) aufgetragen. Nach Chromatographie in n-Butanol, Eisessig, H_2O (4:1:1, v:v:v) wurde mit einer Lösung von 0,3 g Ninhydrin in 1000 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig besprüht. -Nach anschließendem Erhitzen auf 105° zeigte sich, daß noch 1 µg I-hydrochlorid einen deutlich sichtbaren violetten Fleck ergibt.

3.1.2 Papierchromatographischer Nachweis von Glucosamin-hydrochlorid in menschlichem Blutplasma. -Das Humanplasma wurde zunächst schonend enteiweißt: ca. 10 ml Citrat-Blut wurden 20 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Zu 1 ml Überstand wurden 15 ml Isopropanol gegeben, dann wurde erneut 20 Minuten bei 7000 U/min zentrifugiert und der Überstand von 16 ml bei 20° eingedampft.

Der Rückstand wurde in 1 ml H_2O aufgenommen und 0,01 ml davon wie bei 3.1.1 chromatographiert. Nach Besprühen mit Ninhydrin und Erhitzen zeigte sich, daß enteiweißtes Humanplasma I enthält. Die Farbintensität des entstandenen Flecks entsprach ungefähr der eines gleichgroßen, aus 1 µg I-hydrochlorid entstandenen Flecks.

3.1.3 Ergebnis. -Aus dem in Abschnitt 3.1.2 gesagten ergibt sich, daß 1 ml Humanplasma etwa 0,1 mg I enthält. Dieser Wert ist jedoch vermutlich zu hoch (vgl.Lit.3 und 23).

3.2. Versuche zum quantitativen Nachweis von Glucosamin im Humanplasma nach der Methode von SCHWIERSCH

Entsprechend Lit.19 wurde eine Stammlösung von 0,125 g I-hydrochlorid in 25 ml H_2O angesetzt. Hiervon wurden 0,6, 0,4, 0,2 bzw. 0,1 ml entnommen und diese Volumina mit H_2O auf je 2 ml aufgefüllt. Diese Lösungen enthielten daher 1,5, 1,0, 0,5 bzw. 0,25 mg I in 1 ml. Je 0,08 ml der Verdünnungsreihe wurden bei 20° mit je 0,3 ml einer Lösung von 160 mg III (Fa.SERVA, Heidelberg) in 10 ml Aceton und 0,07 ml einer Lösung von 142,8 mg Natriumhydrogencarbonat in 10 ml Wasser versetzt. Im gleichen Arbeitsgang wurden zu 0,08 ml des nach 3.1.2 enteiweißten Plasmas die oben angeführten Mengen an III und an Natriumhydrogencarbonat gegeben. 7 Minuten nach Versuchsbeginn wurde an DC-Karten SiF (Fa.RIEDEL-DE HAEN, Seelze) im System Benzol-Methanol-Dioxan (28:4:56,v:v:v;Laufstrecke:genau 4,5 cm)chromatographiert, wobei darauf geachtet wurde, daß die lichtempfindlichen Dansylverbindungen dem Sonnenlicht nicht ausgesetzt wurden.
Pro Einzelanalyse wurden mittels einer 5 µl-Dosierspritze (SCIENTIFIC GLASS ENGINEERING, PTY,LTD,Melbourne,Australien) je 3 µl aufgetragen.
Für die fluorometrischen Messungen wurde ein Fluorometer (Modell 111, Fa.G.K.TURNER Associates, Palo Alto, USA) mit DC Meßtür (Modell 111-898, Fa.CAMAG AG,Muttenz,Schweiz) sowie ein Servogor-Schreiber mit Integrationseinrichtung

(Typ RE 512, Fa.GOERZ-ELEKTRO GmbH, Wien,Österreich) verwendet. Als Lichtquelle diente eine UV-Fluoreszenzlampe (Typ 110-850), als Filter wurden ein Primärfilter (Typ 110-812) und ein Sekundärfilter (Typ 110-822) benutzt. Die UV-Fluoreszenzlampe und Filter stammten von der Fa. G.K. TURNER Associates, Palo Alto, USA. Am Fluorometer wurde der Empfindlichkeitsbereich 10 gewählt. Im allgemeinen wurde mit einer Spaltbreite im Bereich von 1,5 bis 2,0 mm bei einem Plattenvorschub von 2,4 cm/min (Einstellung 2)gearbeitet. Als geeignet erwies sich eine Schreiberempfindlichkeit von 10 mV und ein Papiervorschub von 40 cm/min.

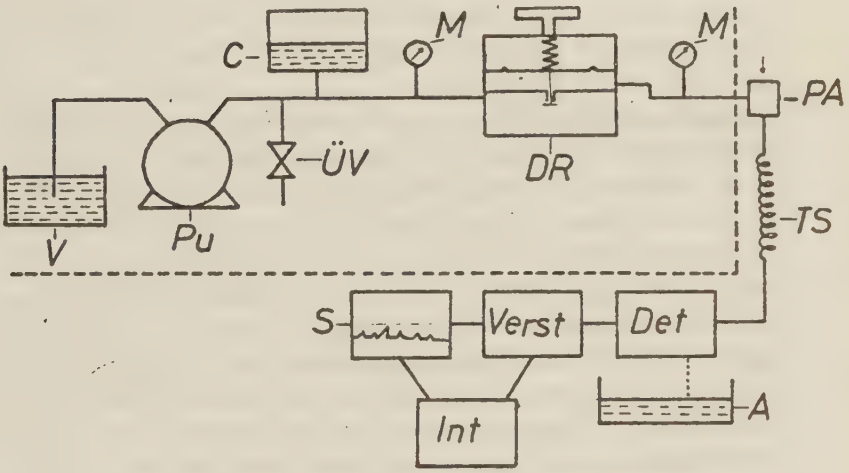
3.2.1 Ergebnisse. -Zahlreiche Bestimmungen ergaben, daß 1 ml Blutplasma 0,25-0,3 mg Glucosamin enthält. Diese Werte sind sehr wahrscheinlich zu hoch, da, wie bereits erwähnt, (Lit. 23) das Human-Blut höchstens Spuren "freier" Aminozucker enthält und nicht anzunehmen ist, daß Substanzen dieser Art während der Enteiweißung aus den Proteinen freigesetzt werden.
Der offenbare Fehler beruht nicht auf eventuell eingetretenen pH-Änderungen, da der pH-Wert eines Gemisches aus Dansylchlorid und enteiweißtem Serum zwischen 6 und 7 liegt. Der Fehler ist auch nicht auf das zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittelgemisch zurückzuführen, denn auch bei Anwendung des zweiten in Lit.19 angeführten Laufmittelgemisches (Isoamylalkohol-Chloroform-Dioxan, 24:15:10;V:v:v; Laufstrecke: 4,5 cm) wurden unter sonst gleichen Arbeitsbedingungen ähnliche Werte gefunden.
Es stellte sich dann heraus, daß entgegen der Angabe von SCHWIERSCH einige Dansylaminosäuren (Fa.SERVA, Heidelberg), nämlich die N-Dansylderivate von L-Alanin, L-Cystin, L-Methionin, L-Tryptophan und L-Tyrosin in den angegebenen Laufmittelgemischen den gleichen oder fast gleichen RF-Wert haben, (0,3 bis 0,4) wie Dansylglucosamin.

3.3 Versuche zum quantitativen Nachweis von Glucosamin in Humanplasma mittels Hochdruckchromatographie

3.3.1 Allgemeines. -Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromato-

graphie (HFC), eine besonders schnelle Analysenmethode, gewinnt seit einigen Jahren immer mehr an Bedeutung, wobei vorauszusehen ist, daß sie bald eine umfangreichere Anwendung finden wird als die Gaschromatographie. Während nämlich gaschromatographisch nur solche Verbindungen untersucht werden können, die ohne Zersetzung verdampfbar sind, können in der HFC auch thermolabile Substanzen geringen Dampfdrucks eingesetzt werden. Erfahrungen über die HFC basieren bisher vornehmlich auf Ergebnissen, die an fettlöslichen Verbindungen (beispielsweise Vitamin A-Derivaten, Steroiden oder Insektiziden) gewonnen wurden (Lit.18). Untersuchungen über die HFC wasserlöslicher Substanzen, zu denen auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit interessierenden Aminozucker gehören, werden in der bisher vorliegenden Literatur viel seltener erwähnt.
Zum Nachweis hochdruckchromatographisch getrennter Substanzen werden vor allem Leitfähigkeitsmeßgeräte, Differentialrefraktometer und -besonders häufig- UV-Detektoren eingesetzt.
Da neben einem HFC-Gerät (vgl.Abschnitt 3.3.2) ein neuentwickelter UV-Detektor (Meßbereich 254 ± 10 nm) zur Verfügung stand, sollte geprüft werden, ob diese Gerätekombination zum Nachweis und zur Bestimmung von Plasma-Aminozuckern verwendet werden kann. Bekanntlich zeigen aber sowohl stickstoffreie Kohlenhydrate als auch Aminozucker bei 254 nm keine Absorption, daher entziehen sie sich der Detektion mittels des erwähnten UV-Detektors. Um Aminozucker dennoch hiermit nachweisen zu können, müssen sie vor der Chromatographie in Derivate überführt werden, die bei 254 nm absorbieren. Da dies bei den N-Dansyl-Aminozuckern der Fall ist, schien es möglich, die bei der Methode von SCHWIERSCH notwendige Dünnschichtchromatographie durch eine hochdruckchromatographische Abtrennung von IV zu ersetzen. Zugunsten dieser Möglichkeit sprachen die Ergebnisse von Modellversuchen (HAAS, Lit.5), aus denen hervorging, daß N-Dansyl-Derivate verschiedener Aminozucker hochdruckchromatographisch trennbar und durch UV-Detektion nachweisbar sind.

3.3.2 Apparatives. -Die Messungen wurden mittels eines von der Arbeitsgruppe HALASZ (Fachbereich 13 der Universität des Saarlandes, Fachrichtung Physikalische Chemie) entwickelten und gebauten HPC-Geräts durchgeführt. Die Funktionsweise dieser Apparatur wird anhand der Schemazeichnung deutlich.



Schemazeichnung 1: HPC-Gerät der Arbeitsgruppe HALASZ (Schema nach Lit.9)

V:Vorratsgefäß; Pu:Pumpe; ÜV:Überdruckventil; C:pneumatische Kapazität; M:Manometer; DR:Druckregler; PA:Probenaufgabe; TS:Trennsäule; Det:Detektor; A:Auffanggefäß; Verst:Verstärker; S:Schreiber; Int:Integrationsgerät.

Die in Schemazeichnung 1 dargestellte Apparatur erlaubt das Arbeiten mit Eingangsdrücken bis zu 250 atm. Gearbeitet wurde jedoch nur bei Drücken von 50 bzw. 72 atm. -Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.
Die Probenaufgabe geschah mittels 5 µl Spritzen (Typ HP 305N der Fa.HAMILTON,Whittier, USA) über ein in Lit.10 beschriebenes und von der Arbeitsgruppe HALASZ weiter entwickeltes Injektionskopfsystem.

Die als Septa empfohlenen Elastomerenscheiben aus Viton A oder Silikongummi erwiesen sich jedoch als nachteilig. Sie mußten häufig gewechselt werden, da ihre Elastizität schnell nachließ, was verstärkt zum Ausstanzen kleiner Elastomerenteilchen und damit -trotz exakter Handhabung- zum häufigen Verstopfen der Kanülen führte. Die erwähnten Septa wurden daher durch solche aus Polyäthylen ersetzt. Sie waren gegen die verwendete mobile Phase beständiger und konnten daher trotz zahlreicher Injektionen mindestens 2 Wochen im Probenaufgabesystem belassen werden. Der Säulenkopf mußte dann auch nur etwa alle 14 Tage von Elastomerenteilchen gereinigt worden.

Druckförderungssystem: Den für die Bewegung der mobilen Phase durch die Trennsäule erforderlichen Druck lieferte eine dreiköpfige Kolbenmembranpumpe (Drillingsmembranpumpe,Dosierpumpe,Typ S4 der Fa.ORLITA KG, Gießen), deren Excenterscheiben um jeweils 120° versetzt sind, um eine Vorglättung der Pumpenstöße zu erreichen. Die eigentliche Druckregelung erfolgte über einen von der Arbeitsgruppe HALASZ entwickelten Flüssigkeits-Druckwandler, der die Pulsation der Pumpe auf 0,5% herabdrückt und gleichzeitig als Sicherheitsventil wirkt. Dadurch wird erreicht, daß Pulsationen der mobilen Phase nicht auf den hochempfindlichen Detektor übertragen werden. Überdies wird ein durch Druckpulsationen bedingter nachteiliger Einfluß auf die Säulenpackung vermieden.

Verwendung fand eine 1 m lange, gerade gezogene Trennsäule (innerer Durchmesser: 2 mm) aus rostfreiem V_2A-Spezialstahl. Sie wurde zunächst mit Salzsäure gespült, dann mit Wasser gewaschen und mit säurefreiem Aceton getrocknet. Nachdem das untere Ende der Kolonne mit einem feinmaschigen Stahlnetz und feiner Teflonwolle verschlossen worden war, wurde die stationäre Phase portionsweise und langsam mittels eines Vibrationsgerätes eingefüllt. Die Mindestmenge der Füllung konnte aus dem inneren Durchmesser und der Länge der Trennsäule errechnet werden. Die gefüllte Säule wurde mit einem zweiten Teflonknäuel verschlossen. Bei den vorliegenden Versuchen wurde als stationäre Phase MERCKOGEL

SI 500Å, 0,040-0,063 mm, 240-400 mesh ASTM, Fa.E.MERCK AG, Darmstadt, benutzt, das nach Vorschrift (KELLER, Lit.15) vorbehandelt wurde: 25 g Merckogel SI 500Å wurden in einen Rundkolben (250 ml) gegeben und 1 Stunde mit einem Gemisch aus 125 ml konz. Schwefelsäure und 20 ml konz. Salpetersäure am Rückflußkühler gekocht (Gesamtzeit mit Auf- und Abheizen: ca.2 Stunden). Der Inhalt wurde in eine Fritte überführt, dann wurde abgesaugt und mit 3 l Wasser nachgespült. Anschließend wurde in einer Porzellanschale bei 60° solange getrocknet, bis das Merckogel wieder pulverig war. Dann wurde nochmals 2 Stunden bei 120° getrocknet.
Als mobile Phase diente ein Gemisch von Dioxan-n-Butanol-Chloroform (KELLER, Lit.15). Dioxan und Chloroform wurden vor Gebrauch bei Atmosphärendruck destilliert; das n-Butanol (p.a.) wurde ohne weitere Reinigung verwendet.
Es wurde bewußt darauf verzichtet, andere Phasen einzusetzen, um so eventuell günstigere Trennungen zu erzielen; vielmehr sollte die Brauchbarkeit für quantitative Bestimmungen untersucht werden.
Zur Detektion der chromatographisch getrennten Substanzen wurde, wie bereits erwähnt, ein von der Arbeitsgruppe HALASZ (Lit.8) entwickelter Durchflußphotometer benutzt, dem folgende Spezifikationen zugrunde liegen: Volumen der Küvette inklusiv Zuleitung: 7 µl; Schichtdicke: 5 mm; i.D.: 1 mm; Durchflußzelle: Z-förmig; Lichtquelle: elektronisch stabilisierte Quecksilberlampe mit Interferenzfilter (254 ± 10 nm); Rauschpegel: $\pm 5 \times 10^{-5}$ Extinktionseinheiten, entsprechend etwa $\pm 10^{-5}$% Benzol in n-Heptan. Der niedrige Rauschpegel wird erreicht durch Unterdrückung sämtlicher Störschwingungen, deren Frequenz größer als 3 Hz ist); liniarer dynamischer Bereich: 1:1000 mit Abweichungen von ± 2%.
Das Detektorausgangssignal wurde auf einen Schreiber (Kompensograph III der Fa.SIEMENS AG, Saarbrücken) gegeben. Bei allen Messungen wurde ein Papiervorschub von 600 mm/Std gewählt, das Gerät auf "calibriert" und die Empfindlichkeit 10 mV x 0,3 mV eingestellt.
Über einen Verstärker konnte die Basislinie (Nullpunkt)

und das vom UV-Detektor auf den Schreiber übermittelte Signal variiert werden (Empfindlichkeitsbereich: 1;2;4; 8;16 usw. bis 1024).

Zur quantitativen Bestimmung der durch den Detektor erfaßten Substanzen, d.h. zur Ermittlung der Flächen unter den entsprechenden Peaks, diente ein Integrationsgerät (Digital Readout System, Modell CRS-108 der Fa.INFOTRONICS Ltd, Industrial Estate, Shannon Airport,Irland) mit Digitalschreiber (Fa.ADDo-x, Modell 353, Malmö,Schweden). Diese Gerätekombination liefert nicht nur digitale Kopien der Peakflächen sondern korrigiert selbstätig die Lage der Nullinie und schlüsselt Peaks auf. Darüber hinaus errechnet sie die Retentionszeiten, d.h. der jeweiligen Verweildauer in der Säule.

Zum besseren Verständnis soll kurz auf die technische Bedeutung der wichtigsten Integrator Schaltknöpfe eingegangen werden. Weitere Einzelheiten müssen der Bedienungsanleitung entnommen werden.

Zur Stabilisierung der Nullinie ("Baselinetracking") dienen:

a) "Rate µV/Min":Dieses System korrigiert automatisch kleinere Abweichungen der Nullinie, d.h. es verhindert das eventuell eintretende Abdriften der Nullinie vor Beginn eines Peaks und somit eine vorzeitig einsetzende Integration.

b) "Attenuator":Je nach Wahl des Empfindlichkeitsbereichs wird die Nullinie in größerem oder kleinerem Ausmaß stabilisiert.

Zur Peakerkennung (Peak Sensing") dienen:

a) "Input Noise Rejektion" und "Peak Rate Minimum Seconds Per Peak":Diese Systeme dienen zur optimalen Rauschunterdrückung bei der Peakerkennung. Die Stellungen "7" und "10" waren in der Regel ausreichend.

b) "Slope Sensitivity" mit den Einstellungen: 3;2;1 max. Je nach Einstellung werden bereits kleinere oder erst größere Driftänderungen erfaßt und somit ein Integrationsstart ausgelöst.

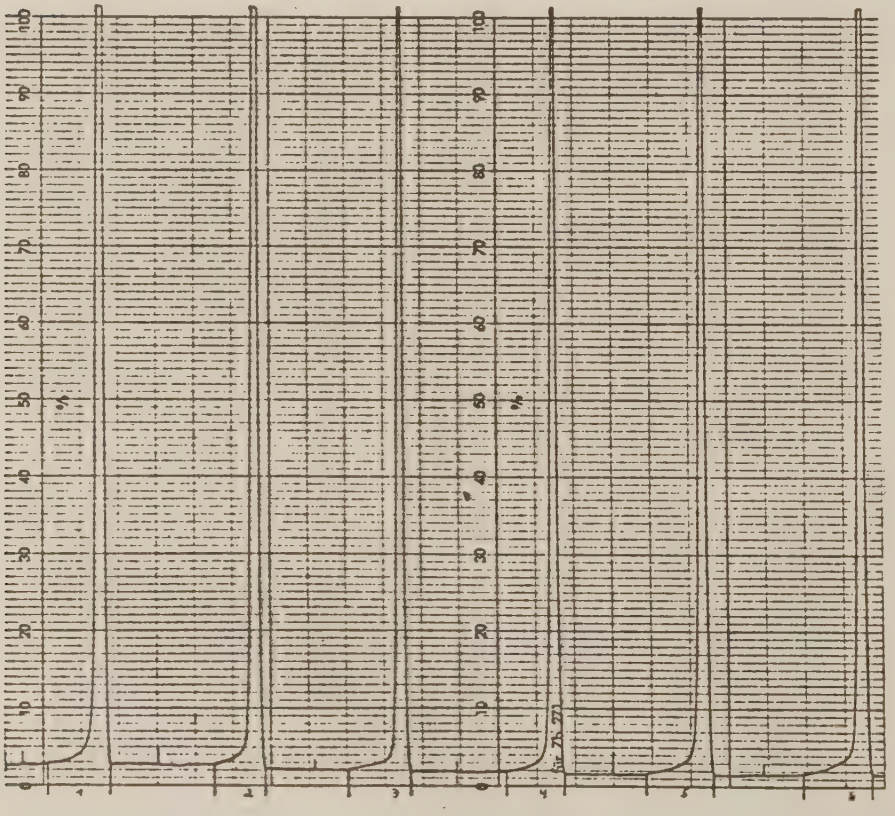
3.3.3 Fehlerquellen. -Die mobile Phase führt die zu untersuchende Probe über die stationäre Phase. Die mobile Phase bewirkt die Beladung der Kolonne mit der Probe und auch die anschließende Elution der getrennten Substanzen. Die Trennung wird erzielt durch die unterschiedliche Vertei-

lung der Substanzen zwischen der mobilen und der stationären Phase. Damit eine schnelle und zuverlässig reproduzierbare Trennung erreicht wird, muß die mobile Phase mit hoher und vor allen Dingen konstanter Strömungsgeschwindigkeit bewegt werden.
Zur Erfüllung dieser Voraussetzungen muß der einmal eingestellte Druck während der Chromatographie konstant bleiben. Druckverluste und damit Strömungsveränderungen können bei der verwendeten Apparatur besonders an dem Flüssigkeits-Druckwandler auftreten, weil eine in ihm befindliche 1,5 mm starke Metallmembran dazu neigt, undicht zu werden. Weiterhin zeigte sich, daß sich die mobile Phase verhältnismäßig schnell verändert, da Dioxan Peroxyde bilden kann, die zusammen mit anderen Zerfallsprodukten die Trennungen verschlechtern und die Nullinie abdriften lassen können. Es erwies sich daher als zweckmäßig, die mobile Phase spätestens nach 3 Tagen zu erneuern. Ein Abdriften der Nullinie kann auch auftreten, wenn Luft- oder Gasblasen den Detektor passieren. Daher ist es von Nutzen, nach Ansatz einer neuen Charge der mobilen Phase, das HFC-Gerät mehrere Stunden mit dem Lösungsmittelgemisch durchspülen zu lassen.
Da bei den vorliegenden Untersuchungen quantitative Bestimmungen möglichst geringer Substanzmengen durchgeführt werden sollten und daher sehr geringe Volumina (0,1-0,5 µl) injiziert werden mußten, wurde darauf geachtet, daß die Probenaufgabe zwar schlagartig, jedoch nicht zu früh erfolgte, damit keine Substanzverluste bereits innerhalb des Septums auftraten. Die Analysenproben durften deshalb erst injiziert werden -dann aber möglichst schnell- wenn das Septum vollständig durchstochen war. Die Injektion, die gegen den Druck der mobilen Phase und deshalb mit einigem Kraftaufwand erfolgen muß, mußte andererseits vorsichtig erfolgen, damit die Mikrolitерspritzen nicht zerbrachen.
Wie sich im Laufe der Meßarbeiten zeigte, wäre ein dem Detektor und dem Schreiber vorgeschalteter magnetischer Spannungskonstanthalter von großem Nutzen gewesen, um

Schwankungen der Eingangsspannung auszugleichen.

3.3.4 Versuche zur quantitativen Bestimmung von Benzol -Zunächst sollte in Erfahrung gebracht werden, ob und unter welchen Bedingungen reproduzierbare quantitative Bestimmungen zu erzielen sind. Als Testsubstanz schien hierfür Benzol (UV-Grenze:280nm; Lit.2) geeignet zu sein. Abb.1 zeigt die auf dem Schreiber erscheinenden Signale nach wiederholter Injektion von Benzol+).

Abb.1:Hochdruckchromatographie von 0,1 µl Benzol an Merckogel SI 500Å; Fließmittel:Dioxan-n-Butanol,Chloroform (15:15:40;V:v:v), Druck:50 atm; F:1,6 ml/min.



+) Die Abb.1 gibt nur eines von zahlreichen analogen Chromatogrammen wieder. Gleiches gilt für Abbildungen 2 bis 10.

Aus Tab.1 gehen die entsprechenden Integrationswerte (in Form relativer Flächengröße) und die Retentionszeiten (in Form von Einheiten des Integrationssystems) hervor.

Tab.1 (zu Abb.1)

Verstärker:4; Rate µV/min:200; Input Noise Rejection:7
Attenuator:5; Slope Sensitivity:2; Peak Rate sec/peak:10.

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit+)
1	10.518.61	6
2	8.633.11	6
3	6.064.89	6
4	6.123.92	6
5	6.675.70	6
6	7.610.31	6
Mittelwert	7.604.42	

Man sieht, daß die Retentionszeit reproduzierbar ist, daß aber die Ungenauigkeiten (bezogen auf den Mittelwert) bis zu 38,3% betragen. Selbst wenn Peak Nr.1 nicht berücksichtigt wird, beträgt die Ungenauigkeit immer noch 23%. Dies beruht vermutlich auf dem bei Raumtemperatur verhältnismäßig hohen Dampfdruck des Benzols, wodurch Verluste beim Einspritzen auftreten können.

3.3.5 Versuche zum reproduzierbaren Injizieren von enteiweißtem Blutplasma. -Um zu prüfen, ob quantitative Bestimmungen im Blut gelöster Substanzen möglich sind, wurde versucht, enteiweißtes Blutplasma reproduzierbar zu injizieren. Die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Methode zur Enteiweißung von Humanplasma wurde durch eine Ultrafiltration ersetzt. Verwendet wurde ein Filtrationsgerät aus

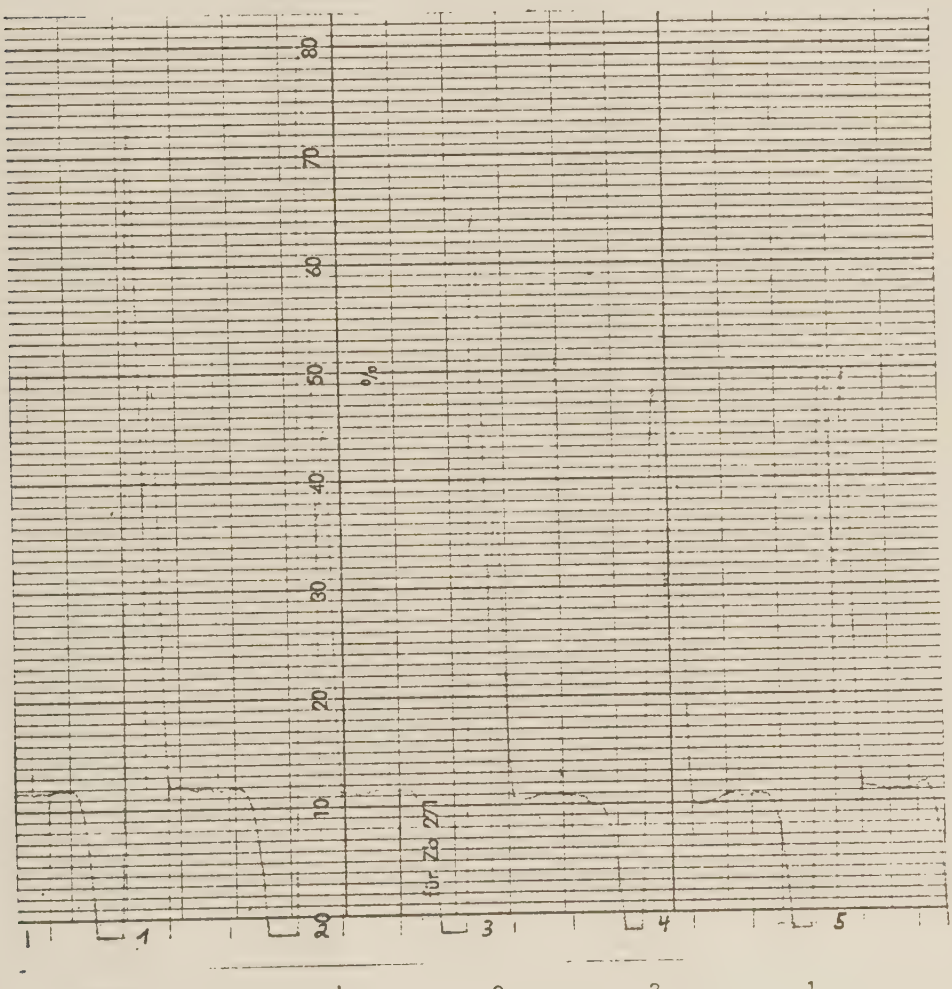
+) Die in den Tabellen 1 bis 10 als Retentionszeiten angegebenen Werte sind Einheiten des Integrationssystems.

Edelstahl (Fa.SARTORIUS Membranfilter-GmbH,Göttingen; Bestellnummer:SM 16223) mit einem Membranfilter (feucht, aus Zellulosenitrat, mittlerer Porendurchmesser: 5 nm; Bestellnummer:SM 12136.025). Filtriert wurde unter einem Stickstoffdruck von 7 atm. -Der sehr empfindliche Eiweißnachweis mit Sulfosalicylsäure war für das Filtrat negativ, auch dann, wenn von hämolysiertem Blut ausgegangen worden war.

Wie aus den Abb. 2 und 3 ersichtlich ist, sind sog. Doppelpeaks, d.h. nicht völlig getrennte Substanzen, charakteristisch, ohne daß Dansylchlorid dem Filtrat beigegeben worden war.

Aus der zur Abb.2 gehörenden Tab.2 geht hervor, daß die Ungenauigkeit (bezogen auf die Mittelwerte) der gemeinsamen quantitativen Erfassung dieses Doppelpeaks bis zu 15,3% und die Ungenauigkeit bei getrennter Erfassung der Peaks bis zu 28,8% betragen kann.Aus der zur Abb.3 gehörenden Tab.3 geht hervor, daß bei der Injektion des Ultrafiltrats von hämolysiertem Blut entsprechende Ungenauigkeiten bis zu 14,8% (Erfassung des Doppelpeaks) bzw. 33,9% auftreten. Dies bedeutet, daß auch die Injektion enteiweißter Blutproben -bei hinlänglich reproduzierbaren Retentionszeiten- nicht genau reproduziert werden kann.

Abb.2: Hochdruckchromatographie von 1 µl enteiweißtem, hämoglobinfreiem Plasma an Merckogel SI 500Å; Fließmittel: Dioxan,Chloroform,n-Butanol (15:40:15;v:v:v); Druck:72 atm; F:1,5 ml/min.



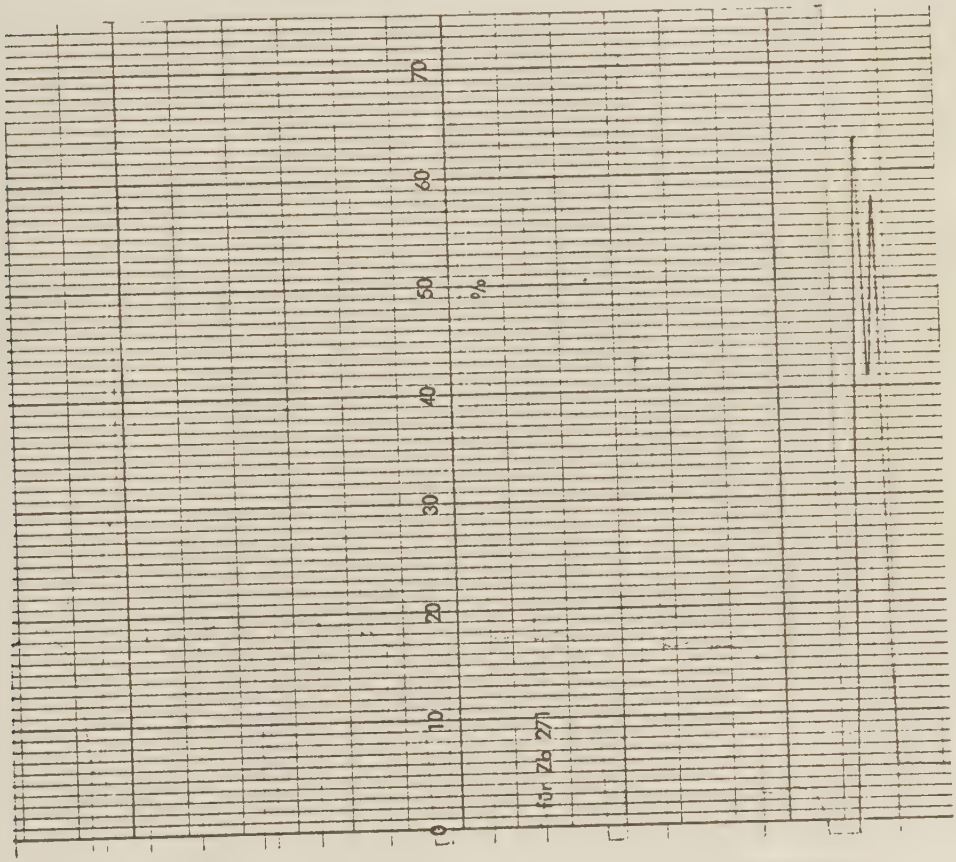
Peak: 5 4 3 2 1

Tab.2 (zu Abb.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	606.81	7.2
b	681.65	9.6
a + b	1.288.46	
2 a	563.24	7.2
b	641.45	9.5
a + b	1.204.69	
3 a	407.40	7.3
b	911.19	9.5
a + b	1.318.59	
4 a	495.86	7.2
b	1.103.91	9.5
a + b	1.599.77	
5 a	578.81	7.3
b	947.17	9.5
a + b	1.525.98	
Mittelwerte:		
a	530.42	
b	857.07	
a + b	1.387.49	

Verstärker:4; Rate µV/min:200; Input Noise Rejection:7;
Attenuator :1; Slope Sensitivity:2; Peak Rate sec/peak:10

Abb.3: Hochdruckchromatographie von 1 µl enteiweißtem, hämoglobinhaltigem Plasma an Merckogel SI 500Å; Fließmittel:Dioxan,n-Butanol,Chloroform (15:15:40;v:v:v); Druck: 72 atm; F:1,5 ml/min.



Peak:5 4 3 2 1

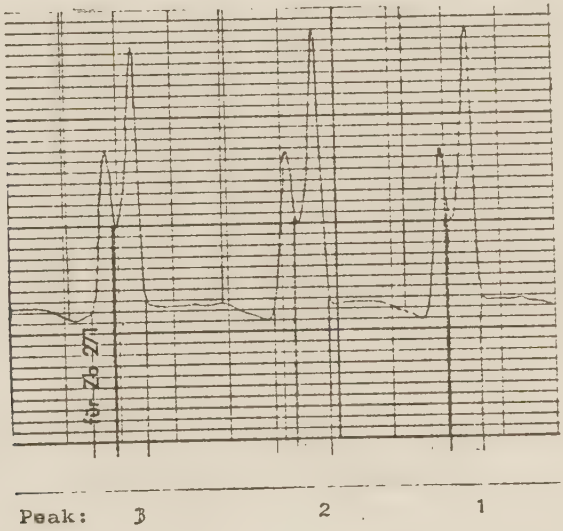
Tab.3 (zu Abb.3) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	769.36	6.8
b	768.81	8.6
a + b	1.538.17	
2 a	545.41	6.8
b	757.30	8.7
a + b	1.302.71	
3 a	612.68	6.9
b	785.77	8.8
a + b	1.398.45	
4 a	794.66	6.9
b	494.05	8.8
a + b	1.288.71	
5 a	744.61	6.8
b	427.57	8.7
a + b	1.172.18	
Mittelwerte		
a	693.34	21,3%
b	646.70	33,9%
a + b	1.340.04	14,8%

Da, meines Wissens, die erwähnten Doppelpeaks bisher noch nicht beobachtet wurden, schien es interessant, die dafür verantwortlichen Verbindungen ausfindig zu machen.
Da für die zu den Abbildungen 2 und 3 führenden Versuche Transfusionsblut verwendet und dieses zur Stabilisierung mit Adenin und Guanosin versetzt worden war, und beide Verbindungen Licht von 254 nm absorbieren (Lit.1), lag die Vermutung nahe, daß die Doppelpeaks durch diese beiden Verbindungen verursacht werden.
Tatsächlich ergeben sowohl Adenin und Guanosin (Fa.SERVA Entwicklungslabor, Heidelberg) als auch eine ACD-Lösung, wie sie für Kreuzproben verwendet wird (Fa.B.BRAUN,Melsungen) unter den zur Chromatographie von enteiweißtem

Blutplasma gewählten Bedingungen befriedigende Chromatographische Bilder. Aus den Retentionszeiten ergab sich jedoch, daß weder Adenin noch Guanosin den bei der Chromatographie von Blutplasma zu beobachtenden Doppelpeak verursachen. In Abbildungen 4 und 5 sind als Beispiele Chromatogramme von Adenin und ACD-Lösung wiedergegeben. Man sieht, daß auch in diesen Fällen lediglich die Retentionszeiten reproduzierbar waren und daß Adenin und die ACD-Lösung ihrerseits einen Doppelpeak ergibt.

Abb.4: Hochdruckchromatographie von 1 µl einer Lösung von 3,4 mg Adenin in 50 ml H_2O.(Bedingungen wie bei Abb.2)

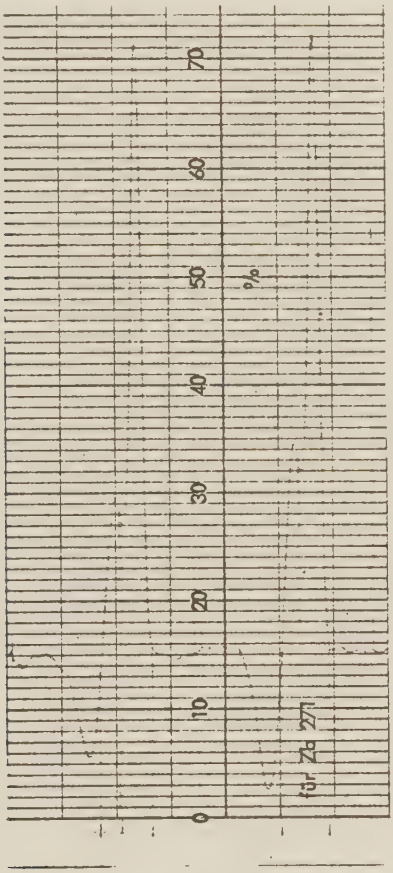


Tab.4 (zu Abb.4) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1	451.95	2
	194.96	4
	646.91	
2	429.34	2
	201.72	4
	631.06	
3.	370.73	2
	220.89	4
	591.62	

Daß auch enteiweißtes Serum nach rascher Aufbereitung (4° ohne Verwendung einer gerinnungshemmenden Substanz) bei der Chromatographie ebenfalls zu Doppelpeaks führt, zeigt die Abb.6. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß die Doppelpeaks weder durch Adenin noch durch Guanosin sondern durch andere Verbindungen bedingt werden.

Abb.5: Hochdruckchromatographie von 0,2 µl ACD-Lösung und Gemisch von IAG: Inosin, Adenin und Guanosin.
(Bedingungen wie bei Abb.2)

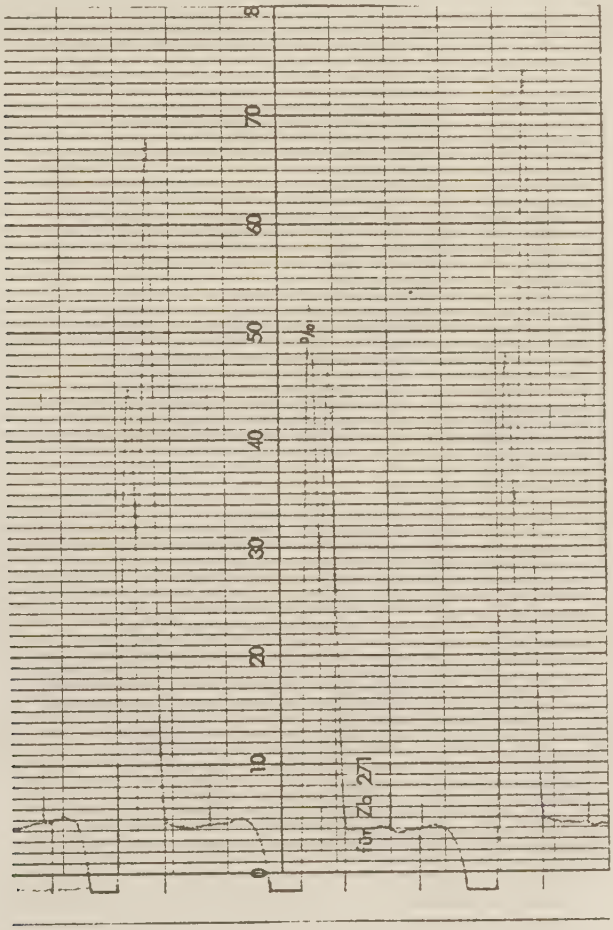


Tab.5 (zu Abb.5): (Bedingungen wie bei Tab. 2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	887.72	6.9
b	223.71	9.0
a + b	1.111.43	
2 a	869.96	6.9
b	181.69	9.4
a + b	1.051.65	

Nach Lit.3 sind im Humanserum aromatische Aminosäuren in meßbaren Mengen vorhanden. -Um zu prüfen, ob diese die Doppelpeaks verursachen, wurden jeweils 5 µl einer Lösung von Tyrosin, Phenylalanin ,Histidin bzw. Tryptophan (Fa. SERVA,Entwicklungslabor,Heidelberg) unter gleichen Versuchsbedingungen injiziert. Obwohl Mengen aufgetragen wurden, die mit den Angaben aus Lit.3 nicht korrelieren, und in einigen Fällen mehrere Peaks auftreten, ist bereits aus den Abbildungen ersichtlich, daß die durch Humanplasma entstandenen Doppelpeaks auch nicht durch diese Aminosäuren zustande kommen können.

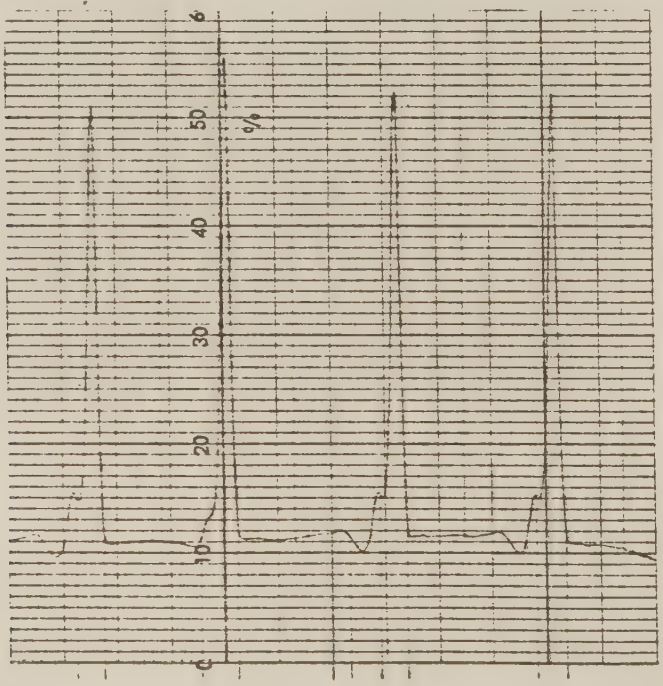
Abb.6: Hochdruckchromatographie von 1 µl enteiweiftem Humanplasma ohne Verwendung einer gerinnungshemmenden Substanz. (Bedingungen wie bei Abb.2)



Tab.6 (zu Abb.6) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	1.072.78	7.1
b	607.52	9.0
a + b	1.680.30	
2 a	659.76	7.0
b	727.86	9.1
a + b	1.387.62	
3 a	1.000.64	7.1
b	583.89	9.1
a + b	1.584.53	

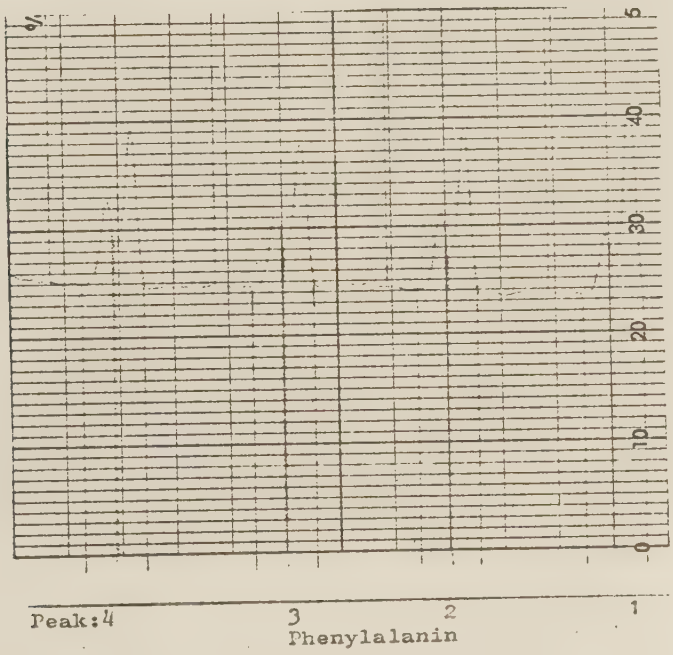
Abb.7: Hochdruckchromatographie von 5 µl einer bei 20° gesättigten wässrigen Lösung von DL-Tyrosin. (Bedingungen wie bei Abb.2)



Tab.7 (zu Abb.7) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1	533.47	9
2	523.26	9
3	549.40	9
4	515.21	8

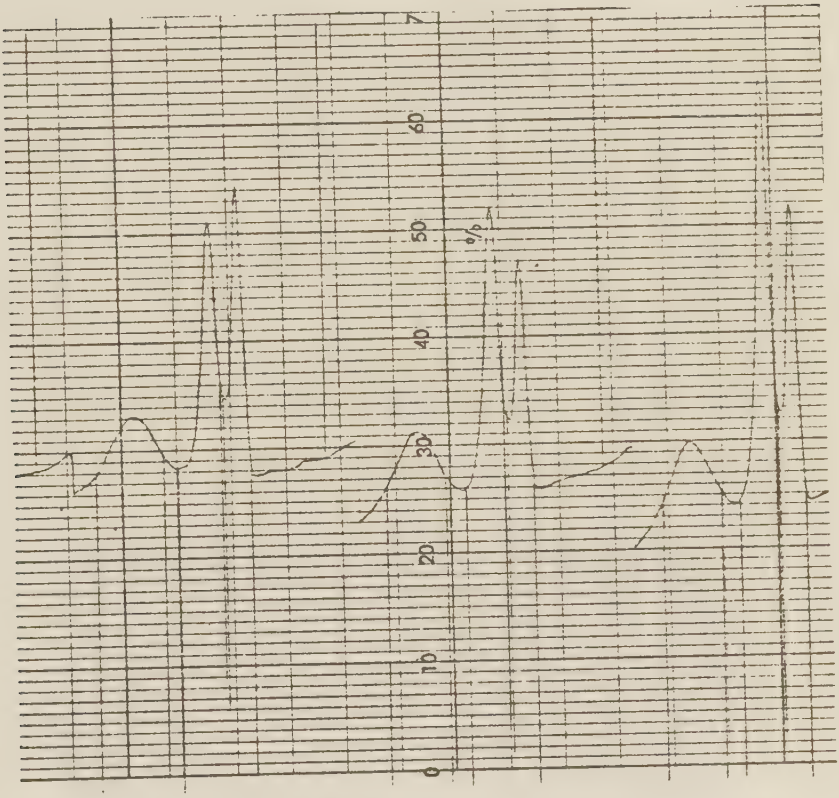
Abb.8: Hochdruckchromatographie von 5 µl Phenylalanin (10 mg/ml H_2O). (Bedingungen wie bei Abb.2)



Tab.8 (zu Abb.8) :(Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	301.29	6
b	72.58	6
a + b	373.87	
2 a	249.25	7
b	98.50	6
a + b	347.75	
3 a	219.18	8
b	88.36	6
a + b	307.54	
4 a	246.04	9
b	110.12	7
a + b	356.16	

Abb.9: Hochdruckchromatographie von 5 µl Histidin (10 mg/ml H_2O) (Bedingungen wie bei Abb.2)

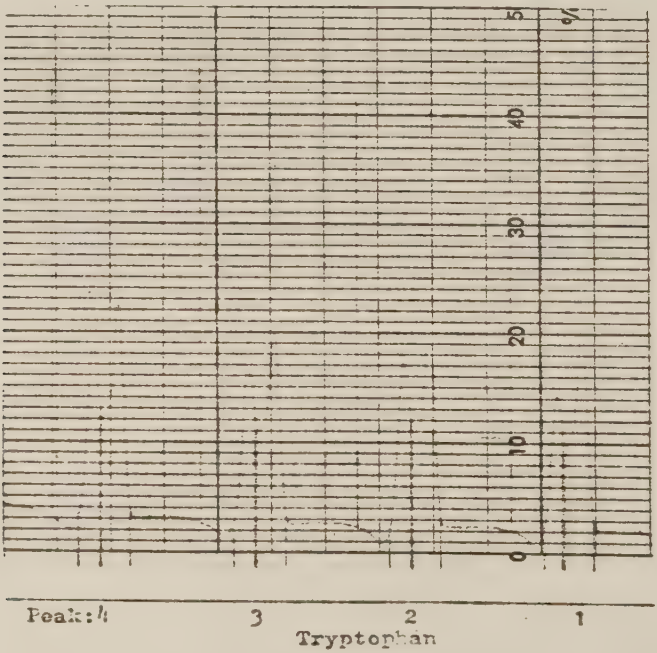


Peak:3 2 1

Tab.9 (zu Abb.9) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	415.14	8
b	693.50	1
c	208.32	5
a,b + c	1.316.96	
2 a	316.11	9
b	480.21	1
c	206.09	8
a,b + c	1.002.41	
3aa	405.38	9
b	423.58	
c	231.26	
a,b + c	1.060.22	

Abb.10: Hochdruckchromatographie von 5 µl Tryptophan (10 mg/ml H_2O) (Bedingungen wie bei Abb.2)



Tab.10 (zu Abb.10) (Bedingungen wie bei Tab.2)

Peak Nr.	Relative Flächengröße	Retentionszeit
1 a	302.66	5
b	129.16	4
a + b	431.82	
2 a	295.18	7
b	185.03	6
a + b	480.21	
3 a	257.90	7
b	146.48	6
a + b	404.38	
4 a	290.68	8
b	171.46	7
a + b	462.14	

4.DISKUSSION

Aus dem in Abschnitt 3 Gesagten geht hervor, daß Bestimmungen von Glucosamin in Humanplasma anhand der Vorschrift von SCHWIERSCH (Lit.19) zu hohe Werte liefern, weil einige Dansylaminosäuren bei der erforderlichen Dünnschichtchromatographie nicht von Dansylglucosamin abgetrennt werden.

Da anzunehmen ist, daß bei der Umsetzung mit III und Natriumhydrogencarbonat auch die Aminosäuren des Plasmas reagieren, werden diese gemeinsam mit I "dansyliert", so daß (vgl.Seite 9) die N-Dansylderivate von L-Alanin, L-Cystin, L-Methionin, L-Tryptophan und L-Tyrosin zusammen mit Dansylglucosamin erfaßt werden.

Wie aus der Tab.11 hervorgeht, enthält das Plasma zwischen 316 und 693 µMol der erwähnten Aminosäuren, so daß der ermittelte Gehalt an I mindestens um diesen Betrag zu hoch ist.

Tab.11 Gehalt des Humanplasmas von Erwachsenen an Aminosäuren, deren N-Dansylderivat gleiche oder ähnliche R_F-Werte haben wie Dansylglucosamin

Substanz	R_F-Wert des N-Dansylderivats[+)]	Gehalt im Plasma µMol/L [++)]
Glucosamin	0,40	
L-Alanin	0,40	213-472
L-Cystin	0,40	70-108
L-Methionin	0,40	11-20
L-Tryptophan	0,40	
L-Tyrosin	0,30	22-83
Summe der Aminosäuren		316-693

[+)] bei Dünnschichtchromatographie an DC-Karten SiF im System Benzol-Methanol-Dioxan (28:4:56,v:v:v)

[++)] Lit.3

Somit muß der Schluß gezogen werden, daß die Originalvorschrift von SCHWIERSCH in der derzeitigen Fassung für die Bestimmung von I in Humanplasma und wahrscheinlich auch in anderen biologischen Materialien, welche die erwähnten Aminosäuren enthalten, nicht geeignet ist.
Die Ergebnisse der hochdruckchromatographischen Versuche zeigen, daß beim gegenwärtigen technischen Stand auch hochdruckchromatographische Verfahren die Ungenauigkeit der Glucosamin-Bestimmungen nicht verringern.
Selbst enteiweißtes Humanplasma (ohne Behandlung mit Dansylchlorid!) kann nicht mit genügend großer Reproduzierbarkeit injiziert werden (vgl.Abbildungen 2 und 3). Daher ist anzunehmen, daß Humanplasma auch nach Reaktion mit Dansylchlorid nicht ausreichend reproduzierbar injiziert werden kann. Somit wären bei Bestimmungen von Glucosamin in Humanplasma Fehler von mindestens 15% zu erwarten. Da die bei der "klassischen" Bestimmung des Glucosamins (MORGAN-ELSON-Reaktion) auftretenden Fehler nicht größer sind, wurden die Versuche, Plasma-Glucosamin durch Dansylierung und Hochdruckchromatographie zu bestimmen, nicht weiter verfolgt.
Worauf der bei der Hochdruckchromatographie von enteiweißtem Humanplasma und UV-Detektoren bei 254 nm auftretende Doppelpeak zurückzuführen ist, kann bis jetzt nicht erklärt werden. Sicher wird dieser Doppelpeak weder durch Adenin, noch durch Guanosin, Bestandteile der ACD-Lösung oder aromatische Aminosäuren verursacht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die von SCHWIERSCH an Modellgemischen ausgearbeitete und zur Bestimmung von Aminozuckern in Synthesegemischen geeignete Methode (Verfolgung der Umsetzungsgeschwindigkeit mit Dansylchlorid) ist für genaue quantitative Nachweise von Glucosamin in Humanplasma nicht geeignet, da einige gleichzeitig mit Dansylchlorid reagierende Plasmaaminosäuren bei der erforderlichen Dünnschichtchromatographie nicht abgetrennt werden. Die vielleicht denkbare Umgehung dieser Störung durch eine hochdruckchromatographische Abtrennung und UV-Detektion (254 nm) von Dansylglucosamin ist bei dem gegenwärtigen technischen Stand der Hochdruckchromatographie nicht möglich, da die Injektion von Analysenproben nicht ausreichend genau reproduziert werden kann. -Die nach Hochdruckchromatographie von enteiweißtem Humanplasma und UV-Detektion zu beobachtenden Doppelpeaks sind weder auf Adenin noch Guanosin, Bestandteile einer ACD-Lösung oder aromatische Plasmaaminosäuren zurückzuführen.

LITERATUR

1) BEAVEN,G.H., HOLIDAY,E.R. and JOHNSON,E.A.
Absorption Spectra of Nucleic Acids
In:CHARGAFF,E. und DAVIDSON,J.N: The Nucleic Acids, VolI,Academic Press Inc.,New York,(1955):493-545

2) BODENSEEWERK:
Einige Grundlagen der Hochdruck-Flüssig-Chromatographie und die Modelle 1210/1220
Angewandte Chromatographie,Heft18, (1973).

3) GEIGY AG:
Documenta Geigy,Wissenschaftliche Tabellen,7.Auflage,(1968):570.

4) GRETH,R.:
Modellversuche zur Elimination von Ammoniak durch Ketosen
Dissertation,Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes,Homburg/Saar,(1972).

5) HAAS,H.J.:
Sonderforschungsbereich 52, "Analytik",Bericht über die Arbeitsergebnisse 1970-1973: 136-143.

6) HAAS,H.J. und WEIGERDING,A.:
Methode zum quantitativen Nachweis von Hexosaminen als N-2,4-Dinitrophenyl-Derivate
Carbohyd.Res.12,(1970):211-218.

7) HAKOMORI,S.: Substances Containing Amino Sugars In Blood Cells And In Hemopoietic Organs In:BALAZS,E.A. and JEANLOZ,R.W.: The Amino Sugars,Vol.IIa,Academic Press,New York-London,(1965): 353-379.

8) HALASZ,I.: Sonderforschungsbereich 52, "Analytik",Bericht über die Arbeitsergebnisse, 1970-1973: 34-35.

9) HALASZ,I.,GERLACH,H.O. KRONEISEN,A. und WALKING,P.: Bandenverbreiterung innerhalb und außerhalb einer flüssigkeits-chromatischen Kolonne Z.Anal.Chem.,234,(1968):97-108.

10) HALASZ,I.,KRONEISEN,A., GERLACH,H.O. und WALKING,P.: Probleme der schnellen Flüssigkeits-Chromatographie mit hohen Eingangsdrucken Z.Anal.Chem.234(1968):81-97.

11) HARRIS,E.D. und JOHNSON,C.A.: Incorporation of Glucosamine-^{14}C into Membrane Proteine of Reticulocytes Biochemistry 8,(1969):512-518.

12) HEYNS,W. und KOCH,W.: Über die Bildung eines Aminozuckers aus D-Fructose und Ammoniak Z.Naturforschung 7b,(1952): 486-488.

13) HEYNS,K. und MEINICKE,K.H.: Über die Bildung und Darstellung von D-Glucosamin aus Fructose und Ammoniak Chem.Ber.88, (1955):1453-1462.

14) HORTON,D.: Detection and Determination of 2-Amino-2-deoxy Sugars In JEANLOZ,R.W.:The Amino Sugars, Vol.IA,Academic Press,New York-London,(1969):4-18.

15) KELLER,H.E.: mündliche Mitteilung

16) KORNFELD,R. und NOLL,C.: Amino Sugar Metabolism in Erythrocytes. Biochim.Biophys.Acta 170,(1968): 77-87.

17) PARDOE,G.I. und UHLENBRUCK,G.: Immunochemical Studies on Red Cells In:DEUTSCH,E., GERLACH,E. und MOSER,K.: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, I.Internationales Symposium,Wien, 17.-20.Juni 1968,Thieme,Stuttgart, (1968).

18) SCHMIT,J.S.: Applications of High-Speed Liquid Chromatography Using Controlled Surface Porosity Support In:KIRKLAND,J.J.: Modern Practice of Liquid Chromatography,Wiley Int. New York-London-Sydney-Toronto,(1971):375-415.

19) SCHWIERSCH,G.: Fluorometrische Bestimmung von Glucosamin Dissertation,Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar,(1970).

20) UHLENBRUCK,G. und PARDOE,G.I., (unter Mitarbeit von HEGGEN,M.)
Die Struktur der Erythrocytenoberfläche
In:DEUTSCH,E.,GERLACH,E.und MOSER,K.:Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten,I.Internationales Symposium,Wien,17.-20.Juni 1968,Thieme,Stuttgart,(1968).

21) WEICKER,H.:
Isolierung eines Xylose-haltigen Glykoproteids aus dem Erythrocyten-Stroma
Z.klin.Chem.u.klin.Biochem.6, (1968):398-406.

22) WEICKER,H.:
Die Bedeutung der Fructose bei der enteralen Ammoniakentgiftung
In:WANAGAT,L:Leber und Milz,4. Lebertagung der Sozialmediziner, Bad Mergentheim,15.-17.10.1965, Stuttgart,(1967).

23) WINZLER,R.J.:
Glycoproteins And Glycosaminoglycans
In Plasma And In Some Other Body Fluids
In:BALAZS,E.A.and JEANLOZ,R.W.: The Amino Sugars,Vol.IIa, Academic Press,New York-London, (1965):337-352.

DANK

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof.Dr. H.J. HAAS, danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Bearbeitung der verschiedenen Sachfragen. Im besonderen danke ich Herrn Prof.Dr. HAAS dafür, daß er in hervorragender Weise dazu beigetragen hat, stets eine außerordentlich günstige Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Herrn Helmut SCHALLMO sei für die Hilfe bei der Wartung des verwendeten Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-Gerätes recht herzlich gedankt.

Für die Bereitstellung des verwendeten Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie-Gerätes bin ich dem S o n d e r f o r s c h u n g s b e r e i c h 52 (Analytik) der D e u t s c h e n F o r s c h u n g s g e m e i n s c h a f t zu besonderem Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF

Am 18.Juni 1943 wurde ich, Peter Heintz, als dritter Sohn des Augenarztes Dr.med.Günther Heintz und seiner Ehefrau Sigrid, geborene Schmidt, in Stettin geboren.
Meine Schulzeit begann ich 1950 in Bremen-Lesum. Nach 6-jähriger Grundschulzeit besuchte ich das Gerhard-Rohlfs-Gymnasium in Bremen-Vegesack. Die Reifeprüfung bestand ich 1965. Im Sommersemester 1965 begann ich das Studium der Naturwissenschaften an der Universität München. Nach zwei Semestern wechselte ich die Fakultät und Universität, um an der Universität des Saarlandes das Medizinstudium aufzunehmen. 1967 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1969 die Ärztliche Vorprüfung und im Dezember 1972 die Ärztliche Prüfung. Seit dem 15.Februar 1973 bin ich als Medizinalassistent tätig.